

**(19) Japan Patent Office (JP)**

**(12) Publication of Patent Application (A)**

**(11) Publication Number of Patent Application: 3-115863**

**(43) Date of Publication of Application: May 16, 1991**

**(51) Int. Cl.<sup>5</sup>            Id. No.            Intraoffice Ref. No.**

**G01N 33/574    B            9015-2G**

**Request for Examination: made**

**Number of Inventions: 3 (total 10 pages)**

**(54) Title of the Invention**

**Quantitative determination of glycolipid by immunological measuring method**

## **SPECIFICATION**

### **1. Title of the Invention**

**Quantitative determination of glycolipid by immunological measuring method**

### **2. Claims**

**1. An immunological measuring method for a quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid which is a glycolipid in a body fluid, characterized by causing a competing reaction of the glycolipid to be measured in the body fluid and a marked glycolipid formed by marking with a marker a glycolipid corresponding to the aforementioned glycolipid, to an antiglycolipid antibody, then separating the marked glycolipid coupled with the antibody and the marked glycolipid not coupled with the antibody, and**

measuring an activity of the marker in either or on both of such separated substances thereby quantitatively determining a glycolipid.

2. An immunological measuring method according to claim 1, wherein the marker is a radioactive substance, an enzyme or a fluorescent substance.

3. An immunological measuring method for a quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid which is a glycolipid in a body fluid, characterized by causing a competing reaction of the glycolipid to be measured in the body fluid and a marked oligosaccharide formed by marking with a marker an oligosaccharide constituting a sugar chain of a glycolipid corresponding to the aforementioned glycolipid, to an antiglycolipid antibody, then separating the marked oligosaccharide coupled with the antibody and the marked oligosaccharide not coupled with the antibody, and measuring an activity of the marker in either or on both of such separated substances thereby quantitatively determining a glycolipid.

4. An immunological measuring method according to claim 3, wherein the marker is a radioactive substance, an enzyme or a fluorescent substance.

5. An immunological measuring method for a quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid which is a glycolipid in a body fluid, characterized by employing an insoluble substance as a carrier, reacting an insolubilized antibody, formed by coupling therewith an antiglycolipid antibody to the glycolipid to be quantitatively determined, with the glycolipid to be quantitatively determined in the body fluid, then causing a reaction with a marked antiglycolipid antibody marked with a marker, and measuring an activity of the marker of the marked antiglycolipid antibody coupled with the glycolipid on the insolubilized carrier thereby quantitatively

determining a glycolipid.

6. An immunological measuring method according to claim 5, wherein the marker is a radioactive substance, an enzyme or a fluorescent substance.

### 3. Detailed Description of the Invention

#### [Applicable Field of the Invention]

The present invention relates to an immunological measuring method for a glycolipid in a biological specimen.

More specifically, the present invention relates to an immunological measuring method for asialo GM<sub>1</sub>, achialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> and paraglobocid, which are glycolipids in a biological specimen, utilizing respectively specific antibodies.

#### [Background Technology]

In Japan, cancer is rated as No. 1 in the death rate and expectation and necessity of an early discovery and an early remedy of cancer are ever increasing. For early discovery, there are a morphological inspection for example by an image diagnosis and an immuno-biochemical inspection which is a non-invasive inspection by sampling a small amount of a body fluid, and the immuno-biochemical inspection is obtaining more importance. In the immuno-biochemical diagnosis for cancer, a significant effort has been made for searching a substance - a tumor-related antigen - which increases significantly by a carcinogenesis in the cells, and for example discoveries of  $\alpha$ -fetoprotein and carcinoembryonic antigen and measuring methods thereof are one of major results of such effort and are already applied clinically. However, from the standpoint of early discovery of cancer, these markers still cannot be considered satisfactory, and a discovery of a new tumor-related antigen, a development of a

measuring method therefor, and a clinical application thereof are strongly desired.

The present inventors have noticed a glycolipid which is one of cell membrane components and, as a result of investigation on a relation between the glycolipid and a cell adhesivity through analyses and metabolism investigations of glycolipid of cancer cells, have succeeded in representing a difference in the cell adhesivity by a difference in glycolipid metabolism. In particular, in highly malignant cancer cells that have lost the cell adhesivity, there is found a biosynthesis path of a glycolipid through a glycolipid that is scarcely found in normal cells. More specifically, the present inventors have come to know that four different glycolipids show an increase with a carcinogenesis of cells, and have identified, through various analyses, these glycolipids as asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> and paraglobocid. Structures of these substances are shown in the following:

asialo GM<sub>1</sub>

Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer

asialo GM<sub>2</sub>

GalNAc-Gal-Glc-Cer

fuco GA<sub>1</sub>

Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer

|

Fuc

paraglobocid

Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer

Gal: galactose, Glc: glucose

**Fuc: fucose, GalNAc: N-acetylgalactosamine**

**GlcNAc: N-acetylglucosamine, Cer: ceramide**

The present inventors have found that these glycolipids increase also in human cancer cells and that a measurement of concentration in the body fluid is extremely useful for cancer diagnosis, and have identified that these constitute novel cancer markers. Also such glycolipids have a very low concentration in the body fluid and a quantitative trace amount analysis applicable to a clinical diagnosis has not been available, but the present inventors have succeeded, in the present invention, in establishing an immunological measuring method for such glycolipids that has a high sensitivity and a high accuracy and can be executed with simple operations.

**[Disclosure of the Invention]**

The present invention is an immunological measuring method for asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> and paraglobocid based on an antigen-antibody reaction based on respectively specific antibodies. More specifically, the present invention provides following methods (1), (2) and (3).

(1) An immunological measuring method for a quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid which is a glycolipid in a body fluid, characterized by causing a competing reaction of the glycolipid to be measured in the body fluid and a marked glycolipid formed by marking with a marker a glycolipid corresponding to the aforementioned glycolipid, to an antiglycolipid antibody, then separating the marked glycolipid coupled with the antibody and the marked glycolipid not coupled with the antibody, and measuring an activity of the marker in either or on both of such separated substances thereby quantitatively determining a glycolipid.

(2) An immunological measuring method for a quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid which is a glycolipid in a body fluid, characterized by causing a competing reaction of the glycolipid to be measured in the body fluid and a marked oligosaccharide formed by marking with a marker an oligosaccharide constituting a sugar chain of a glycolipid corresponding to the aforementioned glycolipid, to an antiglycolipid antibody, then separating the marked oligosaccharide coupled with the antibody and the marked oligosaccharide not coupled with the antibody, and measuring an activity of the marker in either or on both of such separated substances thereby quantitatively determining a glycolipid.

(3) An immunological measuring method for a quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid which is a glycolipid in a body fluid, characterized by employing an insoluble substance as a carrier, reacting an insolubilized antibody, formed by coupling therewith an antiglycolipid antibody to the glycolipid to be quantitatively determined, with the glycolipid to be quantitatively determined in the body fluid, then causing a reaction with a marked antiglycolipid antibody marked with a marker, and measuring an activity of the marker of the marked antiglycolipid antibody coupled with the glycolipid on the insolubilized carrier thereby quantitatively determining a glycolipid.

In the aforementioned immunological measuring method, there are employed a method utilizing a competing reaction utilizing a marked antigen, and a sandwich method utilizing a marked antibody.

An antibody to be employed for quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid can be produced for example by an

intracutaneous injection of such glycolipids mixed with a carrier polymer - such as bovine serum albumin, methylated bovine serum albumin, or erythrocyte membrane protein which is different from the glycolipids - in a non-human animal such as a hare. The present invention is to execute a quantitative determination by an immunological method for asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> or paraglobocid utilizing thus obtained antibody. In the following, the method of the present invention will be explained more specifically, taking asialo GM<sub>1</sub> as an example.

#### 1. Quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub> utilizing a completing reaction

A competing reaction is executed on asialo GM<sub>1</sub> and a predetermined amount of marked asialo GM<sub>1</sub> to a predetermined amount of an antibody, then the marked asialo GM<sub>1</sub> coupled with the antibody and the marked asialo GM<sub>1</sub> not coupled with the antibody are separated, and an activity of the marker in either or on both of the separated substances is measured to quantitatively determine the glycolipid. In such quantitative determining method utilizing a competing reaction using a marked antigen, it is also possible to quantitatively determine asialo GM<sub>1</sub> by executing a similar competing reaction utilizing, instead of the marked asialo GM<sub>1</sub>, a marked oligosaccharide formed by marking a sugar chain portion (oligosaccharide) of the asialo GM<sub>1</sub>.

#### 2. Quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub> by a sandwich method

An insolubilized antibody formed by coupling an antibody with an insoluble substance (carrier) is reacted with asialo GM<sub>1</sub> to be quantitatively determined to form an antibody-asialo GM<sub>1</sub> complex, then such complex is reacted with a marked antibody formed by marking an antibody with a marker to form an antibody-asialo GM<sub>1</sub>-marked antibody sandwich-type antigen-antibody

complex, and an activity of the marker on such antigen-antibody complex is measured to quantitatively determine asialo GM<sub>1</sub>.

In these methods of quantitative determination, an amount of asialo GM<sub>1</sub> is determined from a standard curve, formed in advance by similar operations utilizing, instead of the liquid specimen, asialo GM<sub>1</sub> of a known concentration.

Table 1 shows results of a recovery rate test by this method. Table 1 shows results of a recovery rate test executed by adding asialo GM<sub>1</sub> of various concentrations to specimens of three kinds, and satisfactory results with recovery rates of 82 - 116% were obtained.



Table 1: Recovery rate test

| addition<br>amount<br>(ng/ml) | specimen 1                        |                               |                      | specimen 2                        |                               |                      | specimen 3                        |                               |                      |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------|
|                               | asialo GM <sub>1</sub><br>(ng/ml) | recovery<br>amount<br>(ng/ml) | recovery<br>rate (%) | asialo GM <sub>1</sub><br>(ng/ml) | recovery<br>amount<br>(ng/ml) | recovery<br>rate (%) | asialo GM <sub>1</sub><br>(ng/ml) | recovery<br>amount<br>(ng/ml) | recovery<br>rate (%) |
| 0                             | 15                                | 0                             | -                    | 15                                | 0                             | -                    | 17                                | 0                             | -                    |
| 16                            | 29                                | 14                            | 88                   | 30                                | 15                            | 94                   | 31                                | 14                            | 88                   |
| 31                            | 49                                | 34                            | 110                  | 44                                | 29                            | 94                   | 45                                | 28                            | 90                   |
| 63                            | 75                                | 60                            | 95                   | 70                                | 55                            | 87                   | 90                                | 73                            | 116                  |
| 125                           | 117                               | 102                           | 82                   | 131                               | 116                           | 93                   | 132                               | 115                           | 92                   |
| 250                           | 255                               | 240                           | 96                   | 253                               | 238                           | 95                   | 259                               | 242                           | 97                   |

Also Fig. 1 shows a result of a dilution test by the present method. The dilution curve shows linearity, and indicates a satisfactory result. Based on these recovery rate test and dilution test, it will be understood that this method has a high accuracy as a quantitative determining method for asialo GM<sub>1</sub>.

Also asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> and paraglobocid can be similarly determined by the aforementioned method as in the case of asialo GM<sub>1</sub>.

In the method of the present invention, various body fluids can be used as the object, for example a blood, a lung fluid, ascites or urine.

The marker can be, for example, a radioactive substance, an enzyme or a fluorescent substance.

An insolubilized antibody formed by coupling an antibody to each of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> and paraglobocid to an insoluble substance (carrier) can be prepared by chemically coupling or physically adsorbing such antibody to the carrier. The carrier can be an ordinarily employed one, such as cellulose, cephalose, glass, or plastics such as polystyrene.

As explained in the foregoing, the present inventors have developed a trace amount quantitative determination of a glycolipid utilizing an antigen-antibody reaction for the first time in the world, that enables for the first time a measurement of a concentration of such substance in a body fluid, on various patients including cancer patients.

The measurement of asialo GM<sub>1</sub>, asialo GM<sub>2</sub>, fuco GA<sub>1</sub> and paraglobocid by the method of the present invention shows an excellent reproducibility, a high sensitivity and a high precision and also is simple in operations, thus being very excellent as a daily-use clinical inspection method. A quantitative determination of such glycolipids in the body fluids by the method of the present

invention is, as shown in Figs. 2, 3 and 4 in an example of asialo GM<sub>1</sub>, extremely useful in an early discovery of cancer and a judgment of a therapeutic proceeding.

In the following, the present invention will be further clarified by examples, but the present invention is not restricted by such examples.

#### EXAMPLE

##### I. Preparation of antigen and antibody

##### 1. Purification of antigen (glycolipid)

##### (1) Purification of asialo GM<sub>1</sub>

2.0 g of a glycolipid section of a bovine brain were hydrolyzed for 1 hour at 100°C in the presence of 1N formic acid. After the hydrolysis, an asialo glycolipid section was separated by a DEAE-Cephadex A-25 column chromatography. The obtained crude asialo glycolipid was purified by an Iatrobeds (Iatron Ltd.) column chromatography with a solvent slope of (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 80 : 20 : 0.5 - CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 50 : 45 : 35).

In this manner about 600 mg of purified asialo GM<sub>1</sub> was obtained from 2.0 g of a glycolipid of a bovine brain.

##### (2) Purification of asialo GM<sub>2</sub>

500 mg of GM<sub>1</sub> of a bovine brain were dissolved in an acetate buffer (pH 4.5). 200 mg of sodium periodate were added and the mixture was let to stand for 10 hours at 4°C in a dark place. Then 2 - 3 drops of ethylene glycol were added and a dialysis was executed overnight. A pH value was adjusted to 8.0 with a borate buffer, then 380 mg of NaBH<sub>4</sub> were added and the mixture was let to stand for 12 hours at 0°C. The reaction was terminated with acetic acid, and, after the pH value was adjusted to 4 or lower, a dialysis was executed. After an

addition of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to a concentration of 0.1 N and a reaction for 1 hour at  $80^\circ\text{C}$ , a dialysis was conducted with distilled water, followed by a lyophilization. An obtained powder was dissolved in  $\text{CHCl}_3$  and purified by an Iatrobeads (Iatron Ltd.) column chromatography to obtain about 100 mg of purified asialo  $\text{GM}_2$ .

### (3) Purification of fuco $\text{GA}_1$

30 g of a powder obtained by lyophilizing rat peritoneal liquid-liver cancer AH7974F cells were extracted with 500 ml of a solvent of  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (10 : 5 : 1). A residue after filtering the extract was further extracted in succession with  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1 : 1) and  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1 : 2). After the extracts were united, the solvent was eliminated under a reduced pressure. The residue was further dissolved in a solvent  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (15 : 30 : 4), and an acidic lipid was eliminated by a DEAE-Cephadex A-25 column chromatography.

An obtained neutral glycolipid portion containing fuco  $\text{GA}_1$  was acetylated (acetic anhydride : pyridine = 2 : 3), then a glycolipid portion was separated from other phospholipids by a florisil column chromatography, and a glycolipid section was deacetylated, dialyzed and lyophilized. An obtained powder was dissolved in  $\text{CHCl}_3$  and purified by an Iatrobeads (Iatron Ltd.) column chromatography to obtain about 5 mg of purified fuco  $\text{GA}_1$ .

### (4) Purification of paraglobocid

30 l of bovine blood were centrifuged to obtain erythrocytes, which were dissolved in a 10-times amount of 0.5% acetic acid and centrifuged at 8,000 rpm to obtain an erythrocyte membrane. The erythrocyte membrane was dehydrated by treating with acetone or a 5 - 10 times amount. Then it was extracted in succession with  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 : 1),  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1 : 1), and

$\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1 : 2) and united extracts were concentrated under a reduced pressure. The extract was dissolved in 2 l of a mixed solvent  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 : 1), then mixed well with 500 ml of a 0.9% NaCl solution and an upper layer was separated, then dialyzed and lyophilized. The obtained powder was separated by an Iatrobeds column chromatography to obtain sialosyl paraglobocid formed by bonding sialic acid to paraglobocid. This substance was treated with 1N formic acid for 1 hour at 80°C to detach sialic acid. After a dialysis and a lyophilization, an obtained powder was dissolved in  $\text{CHCl}_3$  and purified by an Iatrobeds column chromatography to obtain about 50 mg of paraglobocid.

## **2. Preparation of glycolipid antibody**

### **(1) Preparation of anti-asialo $\text{GM}_1$ antiserum**

2 mg of asialo  $\text{GM}_1$  and 4 mg of bovine serum albumin were suspended in 1 ml of distilled water. 1 ml of Freund complete adjuvant was added and emulsified. 2 ml of the obtained emulsion were intravenously injected to a hare 3 times at an interval of 2 weeks. A whole blood was collected two weeks after the final injection. Antibodies to asialo  $\text{GM}_2$ , fuco  $\text{Ga}_1$  and paraglobocid could be formed in the same manner.

### **(2) Preparation of anti-asialo $\text{GM}_1$ antibody**

100 ml of the anti-asialo  $\text{GM}_1$  antiserum obtained in the example (1) were subjected to a salting out with a 50% saturation with ammonium sulfate. The precipitate was dissolved in 100 ml of a phosphate buffer (pH 7.2) and salted out with a 20% saturation with ammonium sulfate, to eliminate fibrinogen. The supernatant liquid was salted out with a 35% saturation with ammonium sulfate to obtain a  $\gamma$ -globulin section. The  $\gamma$ -globulin was dissolved in a small amount of

a phosphate buffer (pH 7.2) and subjected to a Cephadex G-200 column chromatography (2.5 x 110 cm). The Cephadex G-200 column chromatography provided a small first peak (IgN section) and a second peak (IgG section). The IgG section was dialyzed with distilled water and lyophilized.

50 mg of the obtained IgG section were dissolved in 30 ml of a phosphate buffer (pH 7.2) and passed through a column filled with 10 ml of AH-cephalose 4B\* coupled with oligosaccharide of asialo GM<sub>1</sub>, and the column was washed with 120 ml of a phosphate buffer pH 7.2). Then the column was eluted with 100 ml of 3.0 M NaSCN. The elution was conducted at 10 ml/hr, and sections of every 5 minutes were collected.

The eluted anti-asialo GM<sub>1</sub> antibody had a specificity of 2<sup>5</sup> - 2<sup>6</sup> complement coupling value/10 - 20 µg protein/ml.

The anti-asialo GM<sub>1</sub> antibody was desalted and concentrated with a PM30 membrane (Amicon).

The column of AH-cephalose 4B coupled with oligosaccharide of asialo GM<sub>1</sub> can be used repeatedly after washing with a phosphate buffer (pH 7.2) until NaSCN is exhausted.

\* Coupling of sugar chain (oligosaccharide) of asialo GM<sub>1</sub> to AH-cephalose 4B

100 mg of asialo GM<sub>1</sub> were dissolved in methanol : hexane (4 : 3) and passed by ozone for 30 minutes. A lipid-like floating substance was eliminated by centrifuging, then an aqueous solution of sodium carbonate was added and the mixture was let to stand for 18 hours at the room temperature (pH 10.5 - 11). Then a centrifuging was conducted for 20 minutes at 10,000 rpm, and a supernatant liquid was added with Dowex 50 (H<sup>+</sup> form) to eliminate sodium ions,

and was subjected to a Cephadex G-25 column chromatography to obtain about 40 mg of oligosaccharide.

5 mg of the obtained oligosaccharide and 20 mg of NaBCNH<sub>3</sub> were dissolved in 20 ml of distilled water. The obtained solution was mixed with 20 ml of AH-cephalose 4B and refluxed for 5 hours. After cooling, the AH-cephalose 4B coupled with the oligosaccharide was separated by centrifuging and washed several times with distilled water.

The AH-cephalose 4B coupled with the oligosaccharide of asialo GM<sub>1</sub> obtained in the aforementioned process was equilibrated with a phosphate buffer (pH 7.2) and was employed for antibody purification.

### 3. Preparation of anti-hare $\gamma$ -globulin antibody

1 mg of hare  $\gamma$ -globulin was dissolved in 2 ml of a physiological saline solution and emulsified with an addition of 2 ml of Freund complete adjuvant. The emulsion was injected to a goat 5 times with an interval of 2 weeks. A whole blood was collected 2 weeks after the final injection, to obtain an antiserum.

## II. Quantitative determination of glycolipid utilizing completing reaction

### 1. Quantitative determination of asialo GM<sub>1</sub>

In a measuring test tube, 100  $\mu$ g of a standard asialo GM<sub>1</sub> or a serum specimen, 100  $\mu$ g of an oligosaccharide-tyrosin-<sup>125</sup>I, and 100  $\mu$ g of anti-asialo GM<sub>1</sub> antibody were added and incubated, then 500  $\mu$ l of an anti-hare  $\gamma$ -globulin antibody were added and an incubation was conducted.

After a centrifuging for 20 minutes at 3,000 rpm, the supernatant liquid was eliminated and a radioactivity of the precipitate was measured.

#### 1-1 Preparation of sugar chain portion of asialo GM<sub>1</sub>

100 mg of asialo GM<sub>1</sub> were dissolved in 20 ml of methanol : hexane (4 : 3),

ozone was passed for 30 minutes. After a lipid-like floating substance was eliminated, an aqueous solution of sodium carbonate was added and the mixture was let to stand for 18 hours at the room temperature (pH 10.5 - 11). Then a centrifuging was conducted for 20 minutes at 10,000 rpm, and Dowex 50 (H<sup>+</sup> form) was added to the supernatant liquid to eliminate sodium ions, and a Cephadex G-25 column chromatography was conducted to obtain about 40 mg of oligosaccharide.

#### 1-2 Preparation of tyrosin derivative of oligosaccharide of asialo GM<sub>1</sub>

5 mg of the oligosaccharide of asialo GM<sub>1</sub> obtained in 1-1 and 20 mg of NaBCNH<sub>2</sub> were dissolved in 20 ml of distilled water, then mixed with 5 mg of diaminoethane and refluxed for 5 hours. After cooling, the reaction liquid was concentrated under a reduced pressure, and a hexylamine oligosaccharide was purified by a Cephadex G-25 column chromatography.

On the other hand, 10 mg of tyrosin were subjected to formation of an N-hydroxysuccinimide ester in the presence of N-hydroxysuccinimide and dicyclohexylcarbodiimide. Then 5 mg of hexylamine oligosaccharide obtained above were added and reacted for 24 - 72 hours at the room temperature. A Cephadex G-25 column chromatography provided about 6 mg of a tyrosin derivative of asialo GM<sub>1</sub> oligosaccharide.

#### 1-3 <sup>125</sup>I marking of oligosaccharide

In a test tube, 20 µg of Na<sup>125</sup>I of 1 mCi, 25 µg of a 0.5M phosphate buffer (pH 7.4), 1.5 µg of a tyrosin-introduced oligosaccharide of asialo GM<sub>1</sub> and 25 µl of chloramin-T (1 mg/ml) were introduced and reacted for about 30 seconds under shaking, and 100 µl of sodium pyrosulfite (1 mg/ml) were added to terminate the reaction.



A Cephadex G-25 column chromatography was conducted to eliminate free  $^{125}\text{I}$  thereby obtaining oligosaccharide-tyrosin- $^{125}\text{I}$ .

### III. Quantitative determination of glycolipid by sandwich method

#### 1. Quantitative determination of asialo $\text{GM}_1$

In a measuring plate, 100  $\mu\text{l}$  of standard asialo  $\text{GM}_1$  or a serum specimen and 100  $\mu\text{l}$  of a 0.1 M borate buffer (pH 8.6) were charged. One anti-asialo  $\text{GM}_1$  antibody bead was added, and, after an incubation, the reaction liquid was eliminated and a washing with a physiological saline solution was conducted twice. Then 200  $\mu\text{l}$  of the anti-asialo  $\text{GM}_1$  antibody- $^{125}\text{I}$  were added and an incubation was conducted. After an elimination of the reaction liquid and a washing with a physiological saline solution three times, the bead was transferred to a counting test tube and a radioactivity was measured.

##### 1-1 Marking of anti-asialo $\text{GM}_1$ antibody

500 polystyrene beads were charged in a 100-ml stoppered bottle. 2  $\mu\text{g}$  of anti-asialo  $\text{GM}_1$  antibody and 0.16 ml of a 0.1M phosphate buffer (pH 7.8) were added per a bead, and the bottle was tightly stoppered and rotated overnight. The beads were washed with a 0.9% NaCl solution five times and dried in a desiccator to obtain a solid-phase antibody.

##### 1-2 $^{125}\text{I}$ -marking of anti-asialo $\text{GM}_1$ antibody

In a silicone-treated test tube, 20  $\mu\text{l}$  of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  of 1 mCi and 25  $\mu\text{l}$  of a 0.5M phosphate buffer (pH 7.5) were added. Then 50  $\mu\text{l}$  of anti-asialo  $\text{GM}_1$  antibody solution were added, and 25  $\mu\text{l}$  of chloramine T (3 mg/ml) were added. After a reaction for 20 - 30 seconds under shaking, 100  $\mu\text{g}$  of sodium metabisulfite (3 mg/ml) were added to terminate the reaction. Then 25  $\mu\text{l}$  of potassium iodide (50 mg/ml) and 100  $\mu\text{l}$  of a bovine serum albumin solution (5%) were added, and

a gel filtration with Cephadex G-25 is conducted to eliminate free  $^{125}\text{I}$ , thereby obtaining  $^{125}\text{I}$ -marked asialo  $\text{GM}_1$  antibody.

#### 1-3 Fluorescein-marking of anti-asialo $\text{GM}_1$ antibody

5 mg of antio-asialo  $\text{GM}_1$  antibody were dissolved in 1 ml of a 0.1M tris-HCl buffer (pH 8.0). To this solution, an NaCl aqueous solution containing 50  $\mu\text{g}$  of fluorescein isothiocyanate (FITC) was added under agitation, then 1N NaOH was added under slow agitation until a pH value of 9.5 was reached, and the mixture was reacted for 1 hour under agitation at the room temperature. After the reaction, the mixture was dialyzed overnight at  $4^\circ\text{C}$  with a 0.01M phosphate buffer (pH 7.6), and a gel filtration with Cephadex G-25 was conducted to obtain a marked antibody.

#### 1-4 Peroxidase marking of anti-asialo $\text{GM}_1$ antibody

After 5 mg of peroxidase were dissolved in 1 ml of a 0.3 M sodium bicarbonate buffer (pH 8.1), 0.1 ml of a 1% ethanol solution of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) and the mixture was reacted for 1 hour at the room temperature. Then the mixture was further mixed with 1 ml of 0.05M sodium periodate and reacted for 30 minutes at the room temperature, then 1 ml of 0.16M ethylene glycol was added and reacted for 1 hour at the room temperature. The mixture was dialyzed overnight at  $4^\circ\text{C}$  to a 0.01M sodium carbonate buffer (pH 9.5), then 5 mg of an anti-asialo  $\text{GM}_1$  antibody was added and reacted for 2 hours at the room temperature. The mixture was let to stand overnight at  $4^\circ\text{C}$  after an addition of 5 mg of sodium hydrogenboride, then was dialyzed overnight at  $4^\circ\text{C}$  to a 0.01M phosphate-buffered sodium chloride solution and gel filtered with Cephadex G-200 to obtain a marked antibody.

#### **4. Brief Description of the Drawings**

**Fig. 1 shows results of a quantitative determination test of the method of the present invention with illustrated dilution rates on three specimens.**

**Fig. 2 shows a plotting of asialo GM<sub>1</sub> values in the serum of cancer patients measured by the method of the present invention, in comparison with values obtained from patients of benign diseases and healthy persons. The abscissa indicates an asialo GM<sub>1</sub> concentration (ng/ml).**

**Fig. 3 shows a plotting of asialo GM<sub>1</sub> values in the serum of cancer patients measured by the method of the present invention, shown by cancer sites.**

**Fig. 4 shows a tracing of asialo GM<sub>1</sub> values in time in the serum of lung cancer patients in the course of a chemical therapy, measured by the method of the present invention.**

**Patent Applicant: Dynabott Co.**

**Patent Applicant: Ryo Matsumoto**

**Agent: Attorney Takao Minami**

## DRAWINGS

Fig. 1

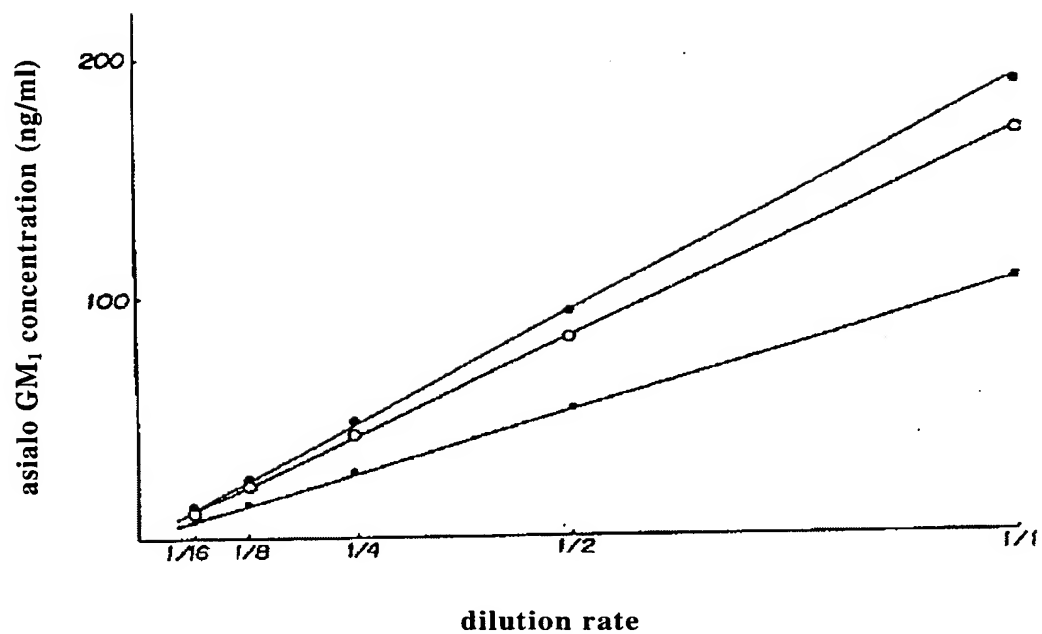
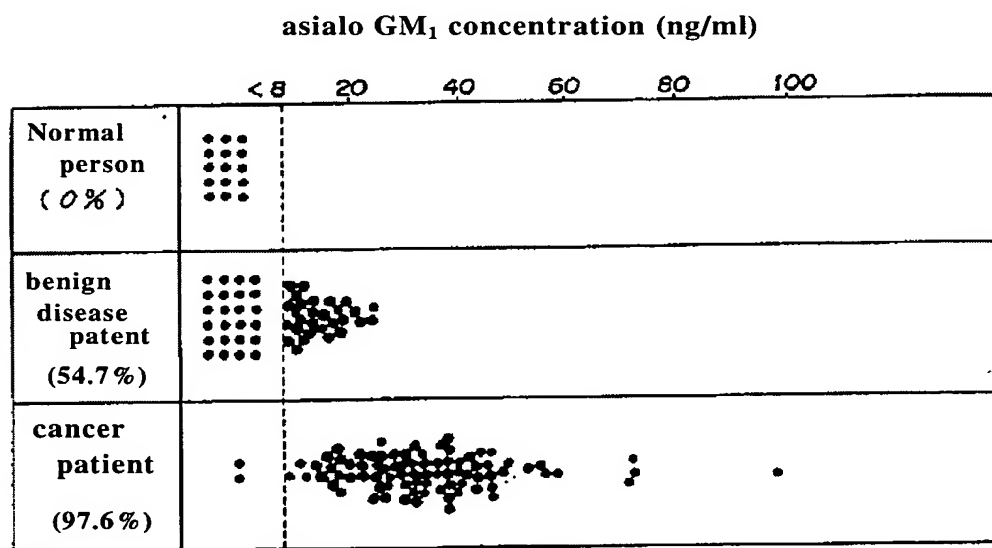


Fig. 2



number in ( ) indicates positive rate

Fig. 3

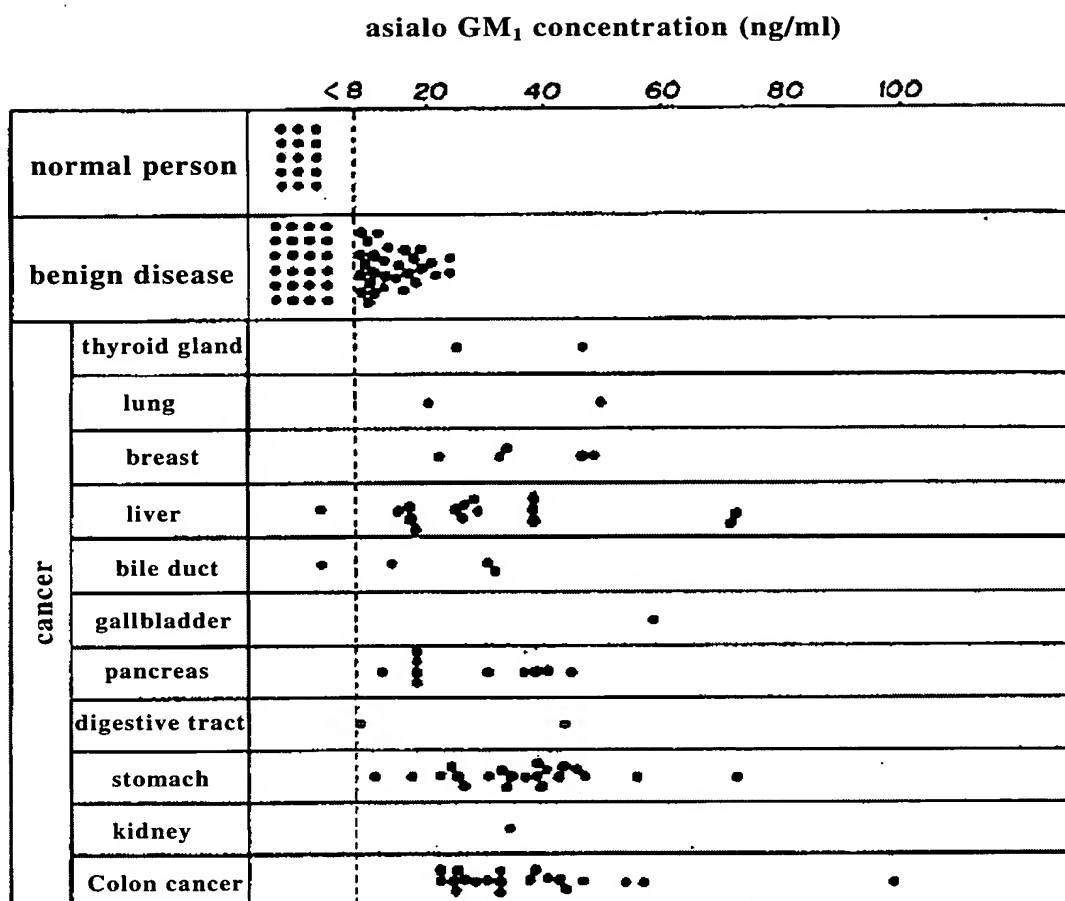
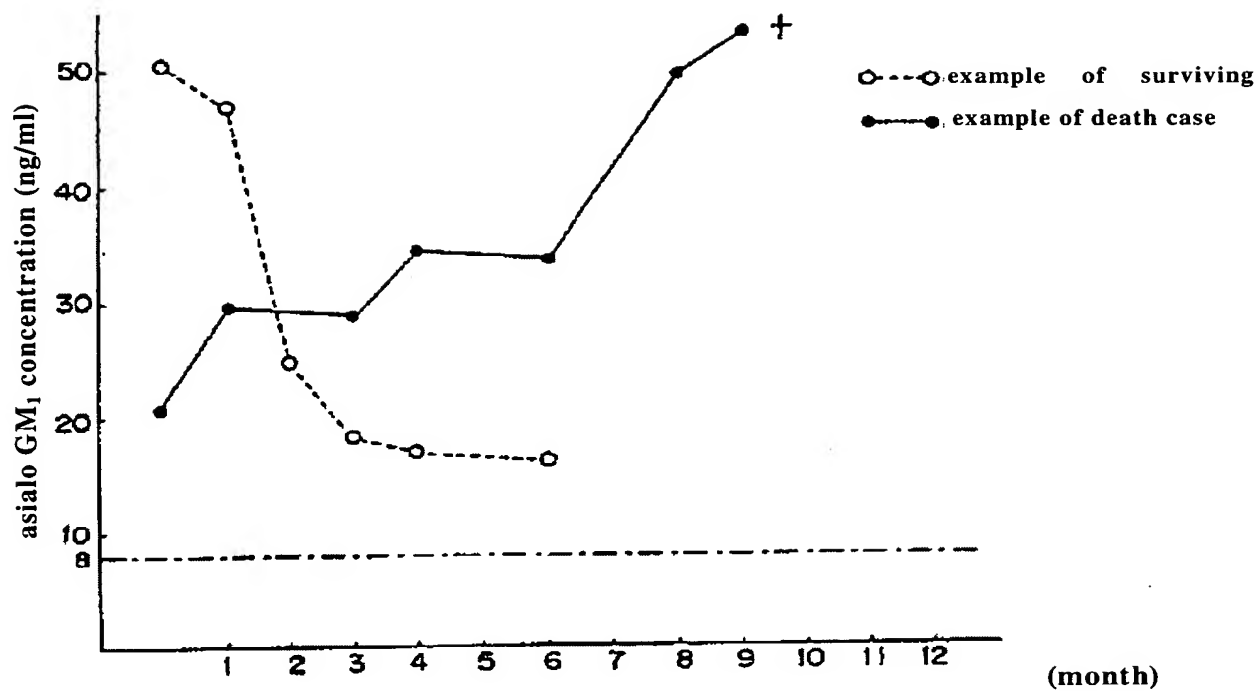


Fig. 4



Continued to page 1

(72) Inventor: Kiyoshi Sekiguchi

624-2 Toyoshiki Kashiwa-shi Chiba

(72) Inventor: Masamichi Obata

2-chome 18-13 Nishiyama Kashiwa-shi Chiba

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-115863

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>  
G 01 N 33/574

識別記号 庁内整理番号  
B 9015-2G

⑭ 公開 平成3年(1991)5月16日

審査請求 有 発明の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 免疫学的測定法による糖脂質の定量方法

⑯ 特 願 平2-236970

⑰ 出 願 昭58(1983)9月9日

⑱ 特 願 昭58-165223の分割

|         |            |       |                         |
|---------|------------|-------|-------------------------|
| ⑲ 発 明 者 | 松 本        | 亮     | 静岡県静岡市北1765-157         |
| ⑲ 発 明 者 | 滝          | 孝 雄   | 静岡県静岡市森下町3-2            |
| ⑲ 発 明 者 | 新 井        | 健 司   | 静岡県浜松市佐鳴台3丁目15-308      |
| ⑲ 発 明 者 | 石 川        | 日 出 美 | 静岡県静岡市古宿140番地           |
| ⑲ 発 明 者 | 倉 田        | 邦 夫   | 千葉県松戸市常盤平双葉町9-1         |
| ⑲ 発 明 者 | 茗 荷        | 昭 男   | 神奈川県横浜市緑区上山町491-26      |
| ⑲ 出 願 人 | ダイナボット株式会社 |       | 東京都港区虎ノ門3-8-21 第33森ビル6階 |
| ⑲ 出 願 人 | 松 本        | 亮     | 静岡県静岡市北1765-157         |
| ⑲ 代 理 人 | 弁理士 南      | 孝 夫   |                         |

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

免疫学的測定法による糖脂質の定量方法

2. 特許請求の範囲

1. 体液中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>あるいはパラグロポシドの定量方法であって、定量しようとする体液中の該糖脂質と、その糖脂質に相当する糖脂質を標識剤で標識した標識糖脂質とを、抗-糖脂質抗体に対して競合反応させ、次いで抗体が結合した標識糖脂質と抗体が結合していない標識糖脂質とを分離し、それらの分画の一方または両方の標識剤の活性を測定することによって糖脂質の定量を行うことを特徴とする体液中の糖脂質の免疫学的測定方法。
2. 前記の標識剤が放射性物質、酵素あるいは蛍光物質である特許請求の範囲第1項に記載の免疫学的測定方法。
3. 体液中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>あるいはパラグロポシドの

定量方法であって、定量しようとする体液中の該糖脂質と、その糖脂質に相当する糖脂質の糖鎖部分であるオリゴ糖を標識剤で標識した標識オリゴ糖とを、抗-糖脂質抗体に対して競合反応させ、次いで抗体が結合した標識オリゴ糖と抗体が結合していない標識オリゴ糖とを分離し、それらの分画の一方または両方の標識剤の活性を測定することによって、糖脂質の定量を行うことを特徴とする体液中の糖脂質の免疫学的測定方法。

4. 前記の標識剤が放射性物質、酵素あるいは蛍光物質である特許請求の範囲第3項に記載の免疫学的測定方法。
5. 体液中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>あるいはパラグロポシドの定量方法であって、不溶性物質を担体とし、それに定量しようとする前記糖脂質の抗-糖脂質抗体を結合させた不溶性抗体に対し、定量しようとする体液中の前記糖脂質を反応させ、次いで標識剤で標識した標識抗-糖脂質

抗体と反応させた後、不溶化抗体上の糖脂質と結合した標識抗-糖脂質抗体の標識剤の活性を測定することによって、糖脂質の定量を行うことを特徴とする体液中の糖脂質の免疫学的測定方法。

6. 前記の標識剤が放射性物質、酵素あるいは蛍光物質である特許請求の範囲第5項に記載の免疫学的測定方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 〔発明の利用分野〕

本発明は生体試料中の糖脂質を免疫学的に測定する方法に関する。

さらに詳しくは本発明は生体試料中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびパラグロボシドをそれぞれに特異的な抗体を用いて免疫学的に定量する方法に関するものである。

#### 〔背景技術〕

日本における死亡率としては癌がその第一位を占めるに至り癌の早期発見、早期治療への期

果、細胞接着性の相違を糖脂質代謝の違いとして表わすことができた。特に細胞接着性を消失した悪性度の高い癌細胞においては正常細胞ではほとんど認められない糖脂質を経由する糖脂質の生合成経路が見い出された。すなわち、本発明者らは、細胞の癌化に伴って増加する糖脂質として4種の異なった糖脂質があることを知り、種々の分析により糖脂質を同定した結果、これらはアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびパラグロボシドであることを明らかにした。それらの構造を下記に示す。



Gal:ガラクトース Glc:グルコース

Fuc:フコース GalNAc:N-アセチルガ

ラクトサミン GlcNAc:N-アセチルグルコサミン Cer:セラミド

待や必要性がますます高まっている。早期発見のためには画像診断法などの形態学的検査と少量の体液採取による非侵襲的検査である免疫生化学的診断法があるが、免疫生化学的診断法がますます重要な地位を占めるに至っている。現在まで癌の免疫生化学的診断法として細胞の癌化によって著しく増量してくる物質—腫瘍関連抗原—の検索に大きな努力が払われており、 $\alpha$ -フェトプロテイン( $\alpha$ -Fetoprotein)や癌胎児性抗原(Carcinoembryonic antigen)などの発見およびその測定法の開発はその大きな成果のひとつであり、臨床上実用に供されている。しかしながら、癌の早期発見という観点からするとこれらのマーカーは充分とは言えないのが現状であり、さらに新しい腫瘍関連抗原の発見とその測定法の開発、臨床面への応用が切に望まれている。

本発明者らは細胞膜成分の一つである糖脂質に注目し、癌細胞の糖脂質分析・代謝研究を通して糖脂質と細胞接着性との関連を研究した結

果、細胞接着性の相違を糖脂質代謝の違いとして表わすことができた。特に細胞接着性を消失した悪性度の高い癌細胞においては正常細胞ではほとんど認められない糖脂質を経由する糖脂質の生合成経路が見い出された。すなわち、本発明者らは、細胞の癌化に伴って増加する糖脂質として4種の異なった糖脂質があることを知り、種々の分析により糖脂質を同定した結果、これらはアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびパラグロボシドであることを明らかにした。それらの構造を下記に示す。

本発明者らは、これらの糖脂質は人癌細胞においても増量し、かつ体液中の濃度を測定することにより癌の診断に極めて有用であることを見出し、それが、新しい癌のマーカーとなることを明らかにした。さらに、体液中のこれらの糖脂質の濃度は非常に低いため、臨床診断に応用できるような微量定量はこれまで不可能であったが、本発明者らは、本発明により高感度で精度の高い操作の簡単なこれらの糖脂質の免疫学的測定法を確立することに成功した。

#### 〔発明の開示〕

本発明は、アシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびパラグロボシドに対するそれぞれに特異的な抗体を用いた抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法によるものである。すなわち、本発明は、下記①、②、③の方法を提供するものである。



① 体液中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>あるいはパラグロポシドの定量方法であって、定量しようとする体液中の該糖脂質と、その糖脂質に相当する糖脂質を標識剤で標識した標識糖脂質とを、抗-糖脂質抗体に対して競合反応させ、次いで抗体が結合した標識糖脂質と抗体が結合していない標識糖脂質とを分離し、それらの分画の一方または両方の標識剤の活性を測定することによって糖脂質の定量を行うことを特徴とする体液中の糖脂質の免疫学的測定方法。

② 体液中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>あるいはパラグロポシドの定量方法であって、定量しようとする体液中の該糖脂質と、その糖脂質に相当する糖脂質の糖鎖部分であるオリゴ糖を標識剤で標識した標識オリゴ糖とを、抗-糖脂質抗体に対して競合反応させ、次いで抗体が結合した標識オリゴ糖と抗体が結合していない標識オリゴ糖とを分離し、それらの分画の一方または両

これらの糖脂質をこれらの糖脂質と異質の担体高分子—たとえばウシ血清アルブミン、メチル化ウシ血清アルブミン、赤血球膜蛋白など—と混合したものを抗原としてヒト以外の動物、たとえば家兎に皮内注射して産生させることができる。本発明においてはこのようにして得られた抗体を用いて体液中のアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびパラグロポシドを免疫学的方法により定量するものである。以下、アシアロGA<sub>1</sub>を例にとり、本発明方法について具体的に説明する。

#### 1. 競合反応を利用したアシアロGM<sub>1</sub>の定量

定量すべきアシアロGM<sub>1</sub>と一定量の標識アシアロGM<sub>1</sub>とを一定量の抗体に対して競合反応させ、次いで抗体と結合した標識アシアロGM<sub>1</sub>と抗体と結合していない標識アシアロGM<sub>1</sub>とを分離し、それらの分画の一方または両方の標識剤の活性を測定してアシアロGM<sub>1</sub>を定量する。このような標識抗原を用いる競合反応を利用した定量方法においては標識アシア

ロGM<sub>1</sub>の活性を測定することによって、糖脂質の定量を行うことを特徴とする体液中の糖脂質の免疫学的測定方法。

③ 体液中の糖脂質であるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>あるいはパラグロポシドの定量方法であって、不溶性物質を担体とし、それに定量しようとする前記糖脂質の抗-糖脂質抗体を結合させた不溶化抗体に対し、定量しようとする体液中の前記糖脂質を反応させ、次いで標識剤で標識した標識抗-糖脂質抗体と反応させた後、不溶化抗体上の糖脂質と結合した標識抗-糖脂質抗体の標識剤の活性を測定することによって、糖脂質の定量を行うことを特徴とする体液中の糖脂質の免疫学的測定方法。

上記の免疫学的測定法としては、標識抗原を用いた競合反応を利用した方法および標識抗体を用いたサンドウィッチ法が用いられる。

アシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびパラグロポシドの定量のために用いる抗体は、

ロGM<sub>1</sub>に代えてアシアロGM<sub>1</sub>の糖鎖部分（オリゴ糖）を標識した標識オリゴ糖を用いて同様に競合反応を行なわせアシアロGM<sub>1</sub>を定量することもできる。

#### 2. サンドウィッチ法を利用したアシアロGM<sub>1</sub>の定量

不溶性物質（担体）に抗体を結合させた不溶化抗体に定量すべきアシアロGM<sub>1</sub>を反応させて、抗体-アシアロGM<sub>1</sub>複合体を形成させ、この複合体に抗体を標識剤で標識した標識抗体を反応させ、抗体-アシアロGM<sub>1</sub>-標識抗体のサンドウィッチ型抗原抗体複合物を生成させ、該抗原抗体複合物上の標識剤の活性を測定してアシアロGM<sub>1</sub>を定量する。

これらの定量方法においては、あらかじめ体液検体の代わりに濃度既知の標準アシアロGM<sub>1</sub>を用い、同様の操作により描いた標準曲線よりアシアロGM<sub>1</sub>の量を求めるものである。

この方法による回収率試験の結果を表1に示した。表1は3種類の検体に種々の既知濃度の

アシアロGM<sub>1</sub>を加えて行なった回収率試験の結果を示すものである。回収率は82%~116%と良好な結果が得られた。

表1. 回収率試験結果

| 試料量<br>(ng/ml) | 1  |                |            | 2  |                |            | 3  |                |            |
|----------------|--|----------------|------------|--|----------------|------------|--|----------------|------------|
|                | 検体<br>アシアロGM <sub>1</sub><br>濃度<br>(ng/ml) | 回収量<br>(ng/ml) | 回収率<br>(%) | 検体<br>アシアロGM <sub>1</sub><br>濃度<br>(ng/ml) | 回収量<br>(ng/ml) | 回収率<br>(%) | 検体<br>アシアロGM <sub>1</sub><br>濃度<br>(ng/ml) | 回収量<br>(ng/ml) | 回収率<br>(%) |
| 0              | 15   | 0              | -          | 15   | 0              | -          | 17   | 0              | -          |
| 16             | 29   | 14             | 88         | 30   | 15             | 94         | 31   | 14             | 88         |
| 31             | 49   | 34             | 110        | 44   | 29             | 94         | 45   | 28             | 90         |
| 63             | 75   | 60             | 95         | 70   | 55             | 87         | 90   | 73             | 116        |
| 125            | 117  | 102            | 82         | 131  | 116            | 93         | 132  | 115            | 92         |
| 250            | 255  | 240            | 95         | 253  | 238            | 95         | 259  | 242            | 97         |

また、第1図によって本法による希釈試験の結果が示される。希釈曲線は、直線性を示しており、良好な結果が得られた。これら回収率試験および希釈試験の結果からも本法がアシアロGM<sub>1</sub>の定量法として正確度の高いものであることが理解されよう。

アシアロGM<sub>1</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびバラグロボシドについても上記の方法によりアシアロGM<sub>1</sub>と同様に定量することができる。

本発明方法において対象とされる体液としては、各種の体液があげられ、たとえば血液、胸水、腹水、尿等がその例である。

標識剤としては放射性物質、酵素および蛍光物質等を挙げることができる。

アシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびバラグロボシドに対するそれぞれの抗体を不溶性物質（担体）に結合させた不溶性抗体は、担体にこれらの抗体を化学的に結合させるかまたは物理的に吸着させることにより製造される。担体としては一般的に用いられているものを使

用することができ、その例としてはセルロース、セファロース、ガラス、ポリスチレンなどのプラスチック等を挙げることができる。

以上述べたように、本発明者らは抗原・抗体反応を利用した糖脂質の微量定量法を世界に先がけて開発し、これにより患者をはじめとする種々の患者について体液中のそれら物質の濃度を測定することがはじめて可能となった。

本発明の方法によるアシアロGM<sub>1</sub>、アシアロGM<sub>2</sub>、フコGA<sub>1</sub>およびバラグロボシドの測定は再現性に優れ、高い感度および精度を示し、かつ操作が簡便で日常の臨床検査法として非常に優れている。本発明の方法による体液中のこれらの糖脂質の定量はアシアロGM<sub>1</sub>を例に第2図、第3図、第4図に示されているように癌の早期発見および治療経過の判定に極めて有用である。

次に実施例を示し本発明をさらに具体的に説明するが本発明はこれによって限定されるものではない。

## 実施例

## I 抗原および抗体の作製

## 1. 抗原(糖脂質)の精製

(1) アシアロGM<sub>1</sub>の精製

牛脳の糖脂質分画2.0gを1Nギ酸存在下で100℃、1時間加水分解する。加水分解終了後DEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーによりアシアロ糖脂質分画を分離した。得られた粗アシアロ糖脂質を溶媒勾配が(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O、80:20:0.5-CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O、50:45:35)であるヤトロビーズ(latrobeads:ヤترون社)カラムクロマトグラフィーによりさらに精製した。

以上より牛脳の糖脂質2.0gより約600mgの精製アシアロGM<sub>1</sub>が得られた。

(2) アシアロGM<sub>2</sub>の精製法

牛脳のGM<sub>2</sub> 500mgを酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解する。200mgの過ヨウ素酸ナトリウムを加え10時間4℃暗所に放置する。エチ

ル媒に溶かし、DEAE・セファデックスA-25のカラムクロマトグラフィーにより酸性脂質を除去した。

得られたフコGA<sub>1</sub>を含む中性糖脂質分画をアセチル化(無水酢酸:ピリジン=2:3)し、これをフロリジルカラムクロマトグラフィーにて糖脂質分画を他のリン脂質から分離し、糖脂質分画を脱アセチル化し、透析後凍結乾燥する。この粉末をCHCl<sub>3</sub>に溶解させヤトロビーズ(latrobeads:ヤترون社)カラムクロマトグラフィーにより精製し、約5mgの精製フコGA<sub>1</sub>を得た。

## (4) パラグロボシドの精製

30gのウシ血液から遠心分離によって赤血球を分離し、10倍量の0.5%酢酸によって溶血させた後8,000rpmにて遠心分離し、赤血球膜を得た。赤血球膜を5~10倍のアセトンで処理し、脱水を行なった。次に20倍量のCHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH(2:1)、CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH(1:1)、CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH(1:2)で

レンジリコールを2、3滴加え一夜透析した。ホウ酸緩衝液でpHを8.0に合わせNaBH<sub>4</sub>を380mg加え、0℃で12時間放置する。酢酸で反応を停止しpHを4以下に合わせた後透析を行なう。0.1NになるようにH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて80℃、1時間反応させた後蒸留水に対して透析を行ない凍結乾燥する。この粉末をCHCl<sub>3</sub>に溶かした後ヤトロビーズ(latrobeads:ヤترون社)カラムクロマトグラフィーにより精製し、約100mgの精製アシアロGM<sub>2</sub>を得た。

(3) フコGA<sub>2</sub>の精製

ラット腹水肝癌AH7974F細胞を凍結乾燥して得た粉末30gに対して500mlのCHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O(10:5:1)の溶媒で抽出した。抽出液をろ過した残渣をさらに同量のCHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH(1:1)およびCHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH(1:2)の溶媒で順次抽出した。抽出液を合わせた後、減圧下溶媒を除去する。さらにCHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O(15:30:4)の溶

媒で順次抽出し、抽出液を合わせた後減圧下濃縮した。この抽出物を2mlのCHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH(2:1)の溶媒に溶かした後、500mlの0.9%NaClを加えよく混和し上層を取り出し透析し凍結乾燥した。この粉末をヤトロビーズカラムクロマトグラフィーにより分離しパラグロボシドにシアル酸の結合したシアロシルパラグロボシドを得る。この物質を1Nのギ酸により80℃で1時間処理しシアル酸をはずす。透析後凍結乾燥し、この粉末をCHCl<sub>3</sub>に溶かしヤトロビーズカラムクロマトグラフィーによって精製し約50mgの精製パラグロボシドを得た。

## 2. 糖脂質抗体の作製

(1) 抗アシアロGM<sub>1</sub>抗血清の作製

アシアロGM<sub>1</sub> 2mgとウシ血清アルブミン4mgを1mlの蒸留水に懸濁させた。この懸濁液にフロインドコンブリートアジュバント1mlを加え乳化した。この乳化液2mlを2週間間隔で家兔に3回皮下注射した。最

後の注射の2週間後に全採血した。アシアロGM<sub>1</sub>、フコGA<sub>1</sub>、パラグロボシドに対する抗体も同様にして作製することができた。

## (2) 抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体の精製

実施例(1)により得られた抗アシアロGM<sub>1</sub>抗血清100mLを硫酸50%飽和で塩析した。沈殿物をリン酸緩衝液(pH7.2)100mLに溶解し、さらに硫酸20%飽和で塩析し、フィブリノーゼンを除去した。上清を硫酸35%飽和で塩析し、 $\gamma$ -グロブリン分画を得た。 $\gamma$ -グロブリンは少量のリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、セファデックスG-200カラムクロマトグラフィー(2.5×110cm)にかけた。セファデックスG-200カラムクロマトグラフィーにより小さな第1ピーク(1g分画)と第2ピーク(1g分画)が得られた。1g分画は蒸留水で透析した後凍結乾燥した。

得られた1g分画50mgをリン酸緩衝液(pH7.2)30mLに溶解しアシアロGM<sub>1</sub>のオリゴ糖

時間室温放置する(pH10.5~11)。その後10,000rpm 20分遠心分離し上清にDowex 50(B<sup>+</sup> form)を加え、ナトリウムイオンを除いた後、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにより約40mgのオリゴ糖が得られた。

得られたオリゴ糖5mgとNaBCNH<sub>2</sub> 20mgを蒸留水20mLに溶解した。この溶液をAH-セファロース4B 20mLと混合し5時間還流した。冷後、オリゴ糖と反応したAH-セファロース4Bは遠心分離し、蒸留水で数回洗浄した。

上記より得られたアシアロGM<sub>1</sub>のオリゴ糖を結合したAH-セファロース4Bはリン酸緩衝液(pH7.2)により平衡化した後、抗体の精製に用いた。

## 3. 抗-家兎 $\gamma$ -グロブリン抗体の作製

家兎 $\gamma$ -グロブリン1mgを生理食塩水2mLに溶かしフロイントコンブリートアジュバント2mLを加え乳化した。この乳化液を

を結合したAH-セファロース4B 10mLをつめたカラムに流した後、カラムをリン酸緩衝液(pH7.2)120mLで洗浄した。次に3.0M NaSCN 100mLで溶出した。毎出は10mL/時間で行ない、5mLずつの分画を集めた。

溶出された抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体の特異活性は2<sup>1</sup>~2<sup>2</sup>補体結合力価/10~20 $\mu$ g蛋白/mLであった。

抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体は脱塩後、PM30膜(Amicon)を用いて濃縮した。

アシアロGM<sub>1</sub>のオリゴ糖を結合したAH-セファロース4BカラムはNaSCNがなくなるまでリン酸緩衝液(pH7.2)で洗浄して繰り返し使用できる。

## \* AH-セファロース4BへのアシアロGM<sub>1</sub>の糖鎖部分(オリゴ糖)の結合

アシアロGM<sub>1</sub> 100mgをメタノール:ヘキサン(4:3)20mLに溶かした後、オゾンで30分間通気する。脂質標浮遊物を遠心分離で除き、炭酸ナトリウム水溶液を加え18

2週間間隔でヤギに5回注射した。最後の注射の2週間後に全採血し、抗血清を得た。

## II 競合反応を利用した糖脂質の定量

### 1. アシアロGM<sub>1</sub>の定量

測定用試験管に標準アシアロGM<sub>1</sub>または血清検体100 $\mu$ Lとオリゴ糖-チロシン-<sup>125</sup>I 100 $\mu$ L、抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体100 $\mu$ Lを加えインキュベーション後、抗-家兎 $\gamma$ -グロブリン抗体500 $\mu$ Lを加えインキュベーションした。

3,000rpmで20分遠心分離後上清を除去し、沈殿の放射能を測定した。

### 1-1 アシアロGM<sub>1</sub>の糖鎖部分の作製

アシアロGM<sub>1</sub> 100mgをメタノール:ヘキサン(4:3)20mLに溶かした後、オゾンで30分間通気する。脂質標浮遊物を遠心分離で除き、炭酸ナトリウム水溶液を加え18時間室温放置する(pH10.5~11)。その後10,000rpm 20分遠心分離し上清にDowex 50

(H<sup>+</sup> form) を加え、ナトリウムイオンを除いた後、セファデックス G-25カラムクロマトグラフィーにより約40mgのオリゴ糖を得られた。

## 1-2 アシアロGM<sub>1</sub>のオリゴ糖のチロシン誘導体の作製

1-1で得られたアシアロGM<sub>1</sub>のオリゴ糖5mgとNaBCNH<sub>2</sub> 20mgを蒸留水20mlに溶解し、これにジアミノヘキサミン5mgを加え5時間還流した。冷却後反応液を減圧下濃縮し、セファデックス G-25カラムクロマトグラフィーによりヘキシルアミンオリゴ糖を精製した。

一方、10mgのチロシンをN-ハイドロキシサクシイミド、ジサイクロヘキシルカルボジイミドの存在下でN-ハイドロキシサクシイミドエステルを形成させる。これに先に得たヘキシルアミンオリゴ糖5mgを添加し24~72時間室温にて反応させる。セファデックス G-25カラムクロマトグラフィー

を除去し生理食塩水で2回洗浄する。さらに抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体-<sup>125</sup>I 200μgを加えインキュベートする。反応液を除去した後生理食塩水で3回洗浄しビーズをカウンティング用試験管に移して放射能を測定した。

### 1-1 抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体の固相化

ポリスチレンビーズ500個を100mlのふた付ビンに入れる。ビーズ1個当たり抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体2μg/0.16ml 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.8)を加え密栓して一夜ローテーションする。0.9%NaCl液で5回洗浄後デシケーター中で乾燥し固相化抗体を得た。

### 1-2 抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体の<sup>125</sup>I 標識

シリコン処理した試験管に1mCiのNa<sup>125</sup>I 20μg、0.5Mリン酸緩衝液(pH7.5) 25μgを加える。抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体液を50μg加え、さらにクロラミンT(3mg/ml) 25μgを加える。20~30秒間よく振って反応させた後、メタ重亜硫酸ソーダ(3mg/ml)

により約6mgのアシアロGM<sub>1</sub>オリゴ糖のチロシン誘導体を得た。

### 1-3 オリゴ糖の<sup>125</sup>I 標識

試験管に1mCiのNa<sup>125</sup>I 20μg、0.5Mリン酸緩衝液(pH7.4) 25μg、チロシンを導入したアシアロGM<sub>1</sub>のオリゴ糖1.5μgおよびクロラミンT(1mg/ml) 25μgを加えた後約30秒間振とう反応させた後、ピロ亜硫酸ナトリウム(1mg/ml) 100μgを加えて反応を停止した。

セファデックス G-25カラムクロマトグラフィーにより遊離の<sup>125</sup>Iを除去し、オリゴ糖-チロシン-<sup>125</sup>Iを得た。

## II サンドウィッチ法を利用した糖脂質の定量

### 1. アシアロGM<sub>1</sub>の定量

測定用プレートに標準アシアロGM<sub>1</sub>または血清検体100μlと0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.6)100μgを入れる。抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体ビーズ1個を加えインキュベート後反応液

100μgを加えて反応を停止する。これにヨウ化カリウム(50mg/ml) 25μg、ウシ血清アルブミン液(5%) 100μgを加え、セファデックス G-25によるゲル透過で遊離の<sup>125</sup>Iを除去し、<sup>125</sup>I 標識抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体を得た。

### 1-3 抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体のフルオレセイン標識

抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体5mgを0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 1mlに溶解した。この溶液にフルオレセインイソチオシアネート(FITC) 50μgの食塩水溶液を攪拌しながら加えた後1N NaOHをpH9.5になるまでゆっくり攪拌しながら加え、さらに室温で1時間攪拌しながら反応させた。反応終了後0.01Mリン酸緩衝液(pH7.6) に対して4℃で一晩透析した後セファデックス G-25でゲル透過し、標識抗体を得た。

### 1-4 抗-アシアロGM<sub>1</sub>抗体のペルオキシダーゼ標識

ペルオキシダーゼ 5mg を 0.3M 重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH8.1) 1ml に溶解した後、1% 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (FDNB) エタノール溶液 0.1ml を加え、室温で 1 時間反応させた。さらに 0.06M 過ヨウ素酸ナトリウム 1ml を加え室温で 30 分間反応させた後、0.16M エチレングリコール 1ml を加え室温で 1 時間反応させた。次に 0.01M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.5) に対し 4℃ で一夜透析した後、抗-アシアロ GM<sub>1</sub> 抗体 5mg を加え、室温で 2 時間反応させた。さらに水素化珪素ナトリウム 5mg を加え 4℃ で一夜放置し、0.01M リン酸緩衝液化ナトリウム液に対し、4℃ で一夜透析した後、セファデックス G-200 でゲル濾過し標識抗体を得た。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は 3 種類の検体を用いて、図に示すような希釈倍率で本発明方法により定量した試験結果を示すものである。

第 2 図は本発明の方法により測定した癌患者血清中のアシアロ GM<sub>1</sub> 値のプロットを示した図であり、良性疾患患者および正常者より得られた値と比較して示されている。横軸はアシアロ GM<sub>1</sub> 濃度 (ng/ml) である。

第 3 図は、本発明の方法により測定した癌患者血清中のアシアロ GM<sub>1</sub> 値のプロットを癌の部位別に示したものである。

第 4 図は本発明の方法により測定した化学療法中の肺癌患者血清中のアシアロ GM<sub>1</sub> 値を経時的に追跡した結果を示すものである。

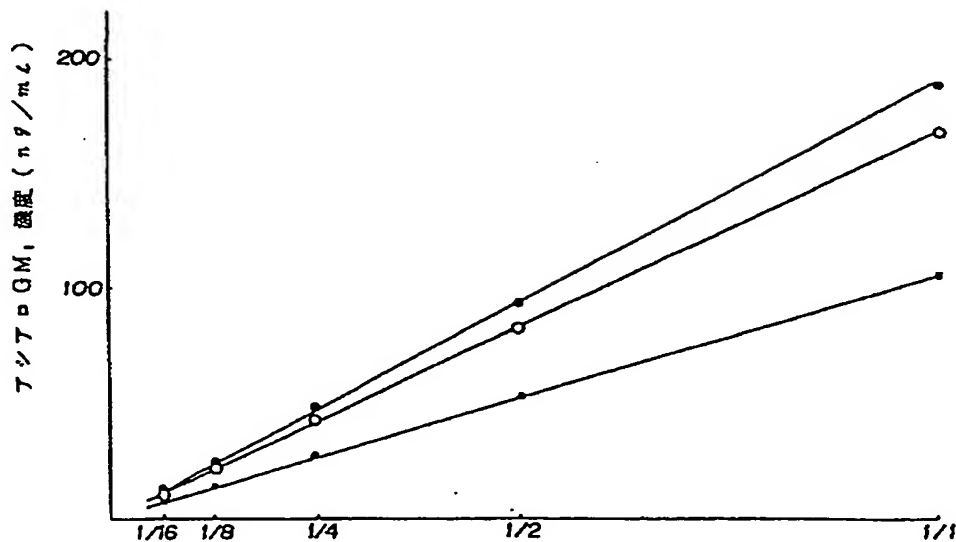
特許出願人 ダイナボット株式会社

同 松 本 亮

代理人弁理士 南 幸 夫

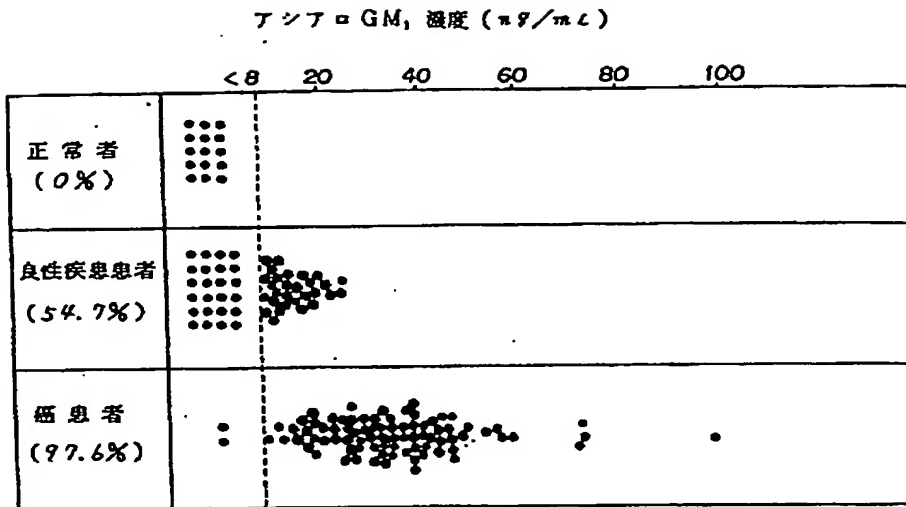


第 1 図



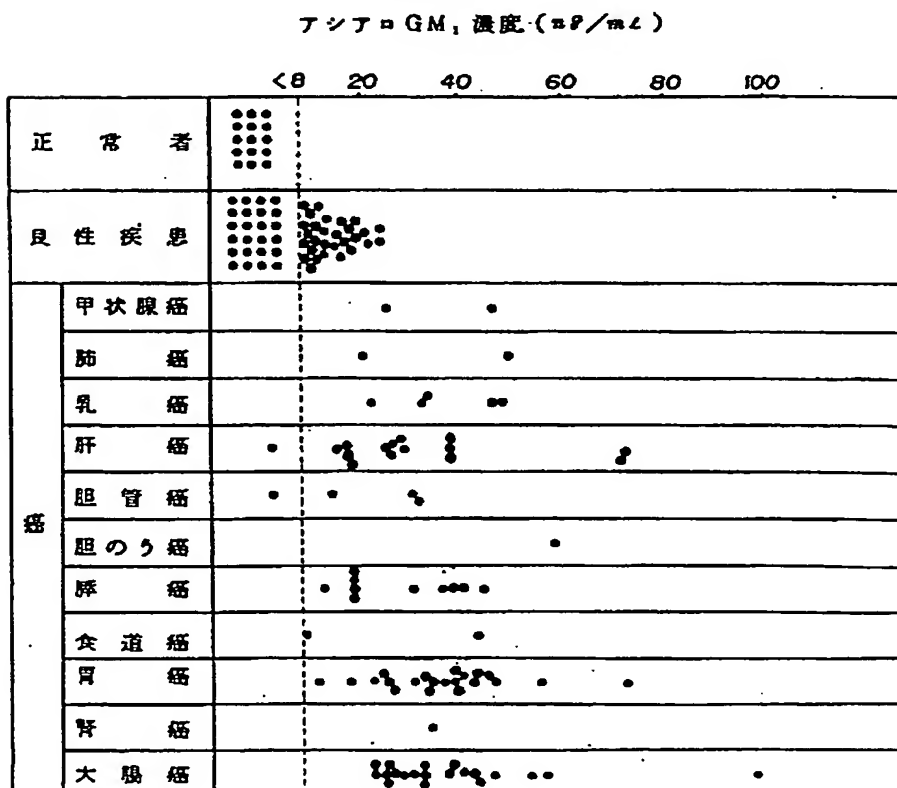
希 釈 率

## 第2図

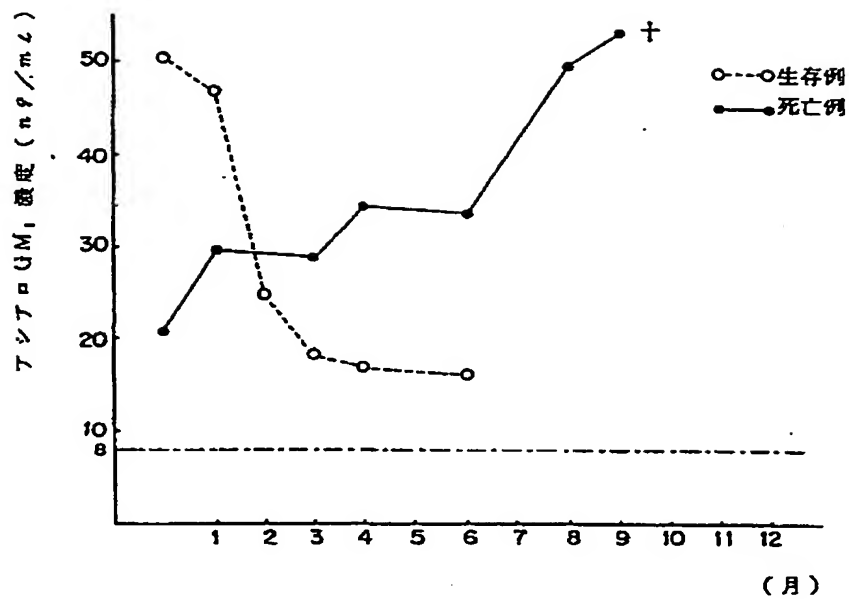


( ) 内 陽性率

## 第3図



第 4 図



第1頁の続き

⑦発 明 者 関 口 潔 千葉県柏市豊四季624-2  
 ⑧発 明 者 小 幡 公 道 千葉県柏市西山2丁目18-13